

# **SUBCELLULÆR LOKALISERING AV DET METASTASEFREMMEDE PROTEINET S100A4**

av

**Javeria Khan**

**Kull V-02**

**Avgangår, januar 2008**

**Veiledere;**

**Dr. Gunhild M. Mælandsmo og Dr. Kristin Andersen  
Rikshospitalet-Radiumhospitalet HF,  
Tumorbiologisk avdeling**



**UNIVERSITETET I OSLO**

**DET MEDISINSKE FAKULTET**

## **ABSTRACT**

### **Subcellular localization of the metastasis-promoting protein S100A4**

The S100A4 protein has been associated with increased metastatic capacity of cancer cells, and several studies have suggested a correlation between the expression level of S100A4 and the prognostic outcome of patients with various types of cancer. S100A4 is located in the extracellular space, the cytoplasm and the nucleus. However, the biological functions of S100A4, and how it is translocated into the nucleus are still uncertain.

The aim of the present study was to elucidate which domains in the S100A4 protein that were responsible for nuclear localization. We constructed a fusion protein consisting of S100A4 and Enhanced Green Fluorescence Protein (EGFP) and three S100A4-EGFP deletion constructs. All constructs were transiently transfected into five different cancer cell lines, and subcellular localization of the overexpressed proteins were studied using fluorescence- and confocal microscopy.

The full-length S100A4-EGFP protein showed a similar subcellular localization as all of the three truncated S100A4-EGFP proteins, with an even protein distribution in the cytoplasm and almost none green fluorescent colour in the nucleus.

In conclusion, we were unable to determine which domains in the S100A4 protein that were important for nuclear localization. Since S100A4 is a small molecule of only 12 kD, it could possibly pass through the nuclear pores without any active transport mechanism being involved.

Supervisors: Gunhild M. Mælandsmo and Kristin Andersen  
Department of Tumor Biology, The Norwegian Radium Hospital.

## INNHALDSFORTEGNELSE

<b>1. INNLEDNING .....</b>	<b>4</b>
1.1 Metastaseprosessen .....	4
1.2 S100A4, et metastaseassosiert protein .....	5
<b>2. PROSJEKTETS MÅLSETNING OG ARBEIDSHYPOTESE .....</b>	<b>5</b>
<b>3. MATERIALER OG METODER .....</b>	<b>6</b>
3.1 Cellelinjer .....	6
3.2 Konstruksjon av plasmid .....	6
3.2.1 Fullengde konstruktet .....	6
3.2.2 Delesjonskonstrukter .....	8
3.3 Oppformering av plasmid .....	8
3.4 Verifisering av delesjonskonstrukter .....	9
3.5 Transiente transfeksjoner .....	9
3.6 Western immunblotting .....	10
3.7 Mikroskopering .....	10
3.7.1 Fluorescens .....	10
3.7.2 Konfokal .....	10
3.7.2.1 Fiksering av preparater .....	10
<b>4. RESULTATER OG DISKUSJON .....</b>	<b>11</b>
4.1 Verifisering av delesjonskonstrukter .....	11
4.2 Fluorescensmikroskopering .....	13
4.3 Konfokalmikroskopering .....	18
<b>5. KONKLUSJON .....</b>	<b>21</b>
<b>REFERANSER .....</b>	<b>23</b>

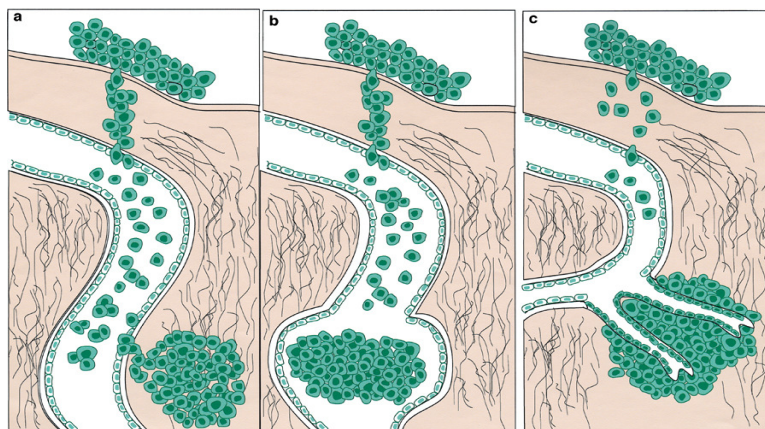
# 1. INNLEDNING

## 1.1 Metastaseprosessen

Spredning av kreftceller er en komplisert biologisk prosess, som er nøye regulert av positive og negative signaler. Både kreftceller og normale omkringliggende celler er involvert. Dannelse av primærtumor starter ved at delingshastigheten til enkelte celler øker, samtidig som apoptose blir redusert. Denne cellemassen får i starten næring via enkel diffusjon. Proangiogenetiske faktorer som secernerer fra tumorcellene bidrar senere til etablering av et kapillærnettverk fra omkringliggende vev. Selve metastaseprosessen kan starte med løsrivelse av celler fra primærsvulsten som baner seg vei inn i sirkulasjonen, ofte gjennom venyler med tynne vegger som f. eks. lymfekanaler. De fleste sirkulerende tumorceller blir tilintetgjort i sirkulasjonen, men de som overlever blir før eller senere fanget i kapillærårene til nærliggende eller fjerntliggende organer. Disse tumorcellene kan adherere seg til overflateantigener på endotelcellene i disse organenes kapillærer, og ekstravasjon finner sted. Proliferasjon i det nye organets parenchym avslutter metastaseprosessen. For å fortsette å vokse må mikrometastasen sørge for sin egen vaskularisering, og unngå destruksjon fra vertens forsvarssystem. Kreftcellene kan igjen invadere blodårene, trenge seg inn i sirkulasjonen og fortsette med produksjon av flere metastaser andre steder i kroppen (fig.1) [1].

For at en kreftcelle skal kunne invadere omkringliggende vev er det en forutsetning at kreftcellen trenger gjennom basalmembranen. Dette har avgjørende betydning for effektiviteten av invasjonsprosessen. Proteaser, enzymer som kløyver proteiner, er nødvendig for nedbrytning av basalmembranen. Det er to hovedtyper som har stor betydning, Matrix Metalloproteinaser og deres hemmere (MMPs/TIMPs), og Urokinase Plasminogen Aktivator systemet (uPA/uPAR/PAIs). Tidligere forskning har vist at evnen til vekst i det sekundære organet er et hastighetsbegrensende trinn i spredningsprosessen, og faktorer som påvirker dette vil være av betydning for om det dannes en metastase [2].

Kolonidannelse, angiogenese og vekst i sekundært organ er prosesser som ofte ikke er fullført ved diagnosetidspunktet. Sett fra et behandlingsmessig perspektiv representerer disse prosessene derfor attraktive angrepspunkter, og en økt forståelse av de molekylære mekanismer som regulerer disse prosessene er derfor nyttig.



**Fig. 1. Metastaseprosessen.** a. En tumor sprer seg til andre organer ved å krysse blodåre- eller lymfeårevæggen direkte. Lymfesystemet overfører sitt innhold til blodsirkulasjonen. Cellene invaderer så sekundært vev. b. Celler som har kommet inn i en lymfeåre kan bli fanget i lymfeknuter og føre til dannelse av en metastase der, med forstørret lymfeknute som resultat. c. Tumoren har vokst i det sekundære vev, og dannet sitt eget blodåresystem. Spredning fra både primær- og sekundærsvulsten fortsetter. Figuren er kopiert fra: [3].

## 1.2 S100A4, et metastaseassosiert protein

S100A4-proteinet hører til familien S100-proteiner. Det er blitt identifisert mer enn 20 forskjellige proteiner i denne gruppen, alle med  $\text{Ca}^{2+}$  bindende egenskaper. S100A4 har på flere m ter blitt assosiert med økt metastatisk kapasitet i kreftceller. Dette er blitt vist ved blant annet å blokkere uttrykket av proteinet, som igjen førte til at cellens evne til spredning ble nedsatt [4]. Det er også blitt oppdaget en korrelasjon mellom uttrykk av proteinet og prognostisk utkom av forskjellige typer cancer. Jo mer av proteinet som uttrykkes jo dårligere blir prognosen [5].

Spesielt i mamma- og colon cancer spiller dette proteinet viktig rolle for metastasering [6, 7]. Hvordan S100A4 gir kreftcellene økt evne til spredning er fremdeles ukjent. På tross av 15 års forskning har man fremdeles begrenset kunnskap om den biologiske funksjonen til proteinet.

S100A4 har blitt funnet lokalisert i cytoplasma sammen med cytoskjelettproteiner. Studier har vist at dette muligens gjør proteinet i stand til å øke cellens motilitet og dermed øke cellens metastatiske potensial. Transeksjonsfors k har vist at økt uttrykk av S100A4 i celler gir økt evne til motilitet [8].

S100A4 er også vist å kunne interagere med mange andre bindingspartnere, blant annet tumor suppressorproteinet p53 [9]. Interaksjon med p53 vil kunne gjøre proteinet i stand til å påvirke fundamentale cellulære hendelser, som regulering av cellesyklus og apoptose.

Flatmark *et al* fant at S100A4 også befinner seg i cellekjernen, men kunnskapen om hvordan proteinet translokeres til kjernen og hvilken funksjon det har der, er mangelfull [10]. Kjernelokalisert protein er blitt assosiert med avanserte stadier av colon cancer. I tillegg er proteinet blitt detektert ekstracellulært og i kroppsvæsker. Ekstracellul rt S100A4 gir økt proteolytisk aktivitet på overflaten av celler og bidrar dermed til spredningsprosessen [11-13]. Det gjenstår imidlertid å finne ut mer om hvilke mekanismer som er ansvarlig for at proteinet secernerer og hvilke funksjoner det utøver ekstracellulært.

## 2. PROSJEKTETS MÅLSETNING OG ARBEIDSHYPOTESE

I løpet av de siste årene er det blitt publisert flere arbeider som forsøker å belyse den biologiske funksjonen til S100A4. Mye tyder på at dette proteinet har flere ulike funksjoner avhengig av hittil ikke definerte faktorer som celletype, subcellulær lokalisering, tilgjengelighet av bindingspartnere, posttranslasjonelle modifiseringer og så videre. Forskningsgruppen jeg har jobbet i, har flere pågående prosjekter der ulike angrepsvinkler blir benyttet for å studere mekanismer av betydning for den biologiske funksjonen til dette proteinet.

Målsetningen til dette prosjektet var å studere hvilke deler av proteinet som har betydning for subcellulær lokalisasjon. Arbeidshypotesen var at den C-terminale delen av proteinet som sannsynligvis koder for et kjernelokaliseringssignal er ansvarlig for at proteinet blir translokert til cellekjernen. Dette ville vi undersøke ved å lage delesjonskonstrukter av proteinet. Det innebærer at man kutter vekk den sekvensen av proteinet man antar koder for kjernelokaliseringssignalet, for da å undersøke om det trunkerte proteinet forblir i cytoplasmaet, eller ikke.

Forskningsgruppen jeg arbeidet i har resultater som viser at S100A4 kan binde seg til DNA i nærvær av  $\text{Ca}^{2+}$ . Med dette som grunnlag ville vi lage fusjonsproteiner som kun inneholdt den ene av de to kalsiumbindende EF-hendene som man antar binder seg til DNA. Hypotesen var at bare den ene hånden av proteinet muligens ikke ville være tilskrekkelig for bindingen til DNA, og delesjon av en EF-hånd ville resultere i at proteinet ikke forble i cellekjernen.

### **3. MATERIALER OG METODER**

#### **3.1 Cellelinjer**

Totalt fem humane cancer cellelinjer ble benyttet. OHS celler kommer fra osteosarkom [14], PM1 fra mamma cancer (begge etablert ved Tumorbiologisk Avdeling, Radiumhospitalet), SW620 fra colon cancer ((American Type Culture Collection (Manassas, VA)[15]), Hela celler fra cervix cancer (American Type Culture Collection (Manassas, VA, US)), og II-11b celler er ribozymtransfektet OHS (osteosarkom) [4]. Celler i kultur vedlikeholdes ved sterilt celledarbeid, som blant annet innebærer å løsne celler fra underlaget i en flaske, telle celler i representative uttak, så ut celler i ulike fortyndinger, og tilslutt transfektere cellene med EGFP-S100A4 konstrukter.

#### **3.2 Konstruksjon av plasmid**

##### **3.2.1 Fullengde konstruktet**

For å visualisere S100A4 i både levende og fikserte celler i mikroskopet, lagde vi et fusjonsprotein av S100A4 og Enhanced Green Fluorescence Protein (EGFP). EGFP avgir grønn fluorescens når det blir uttrykt i celler. Siden S100A4 og EGFP henger sammen kan vi på denne måten detektere S100A4 proteinet inne i cellene. Tilstedeværelse av S100A4 i cellene ble også senere verifisert med Western immunblotting (s.9).

Vektoren pEGFP-C1 (Clontech) (fig.2a) ble brukt for å konstruere fusjonsproteinet og delesjonskonstruktene. Den består av 4.7 kb. EGFP utgjør en del av vektoren, og ligger inntil sekvensen med multiple klonings seter (MCS). I MCS området ligger flere restriksjonskutt seter som vi brukte for å kloner inn de ulike konstruktene. Den kodende sekvensen (CDS) av S100A4 (fig.2b) ligerte vi inn i denne vektoren.

For å lage pEGFP-C1/S100A4, et fullengde ekspressjonskonstrukt av S100A4 proteinet, lineariserte vi først vektoren med restriksjonsenzymene *Bgl*III og *Pst*I. Deretter tilsatte vi CDS av S100A4 og liggeringsenzymen sammen med løsningen av den lineariserte vektoren, slik at CDS ble limt inn i den.

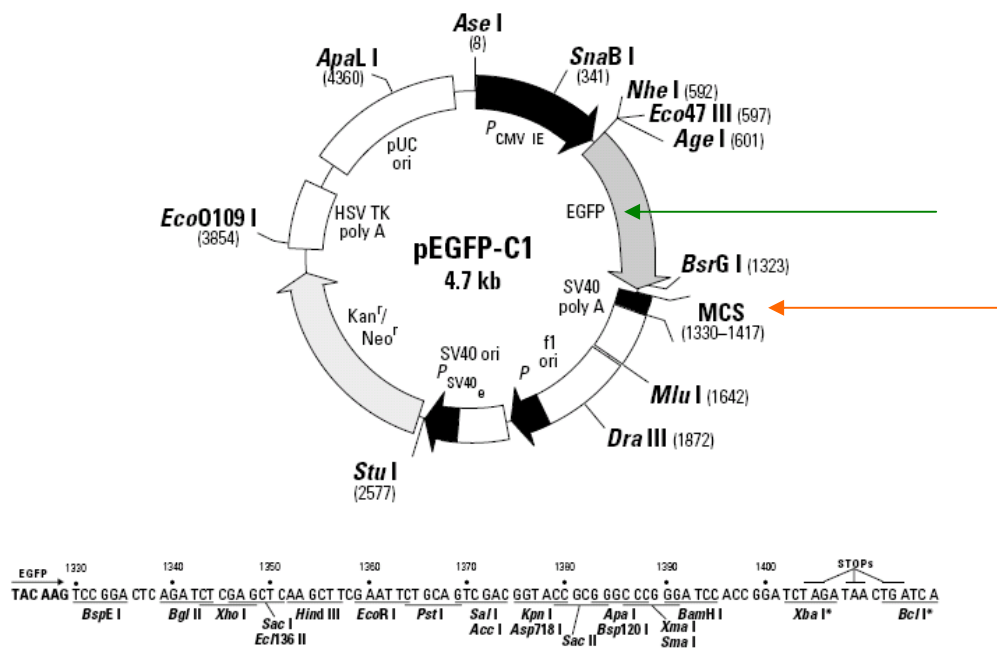


Fig. 2a) pEGFP-C1, tom vektor

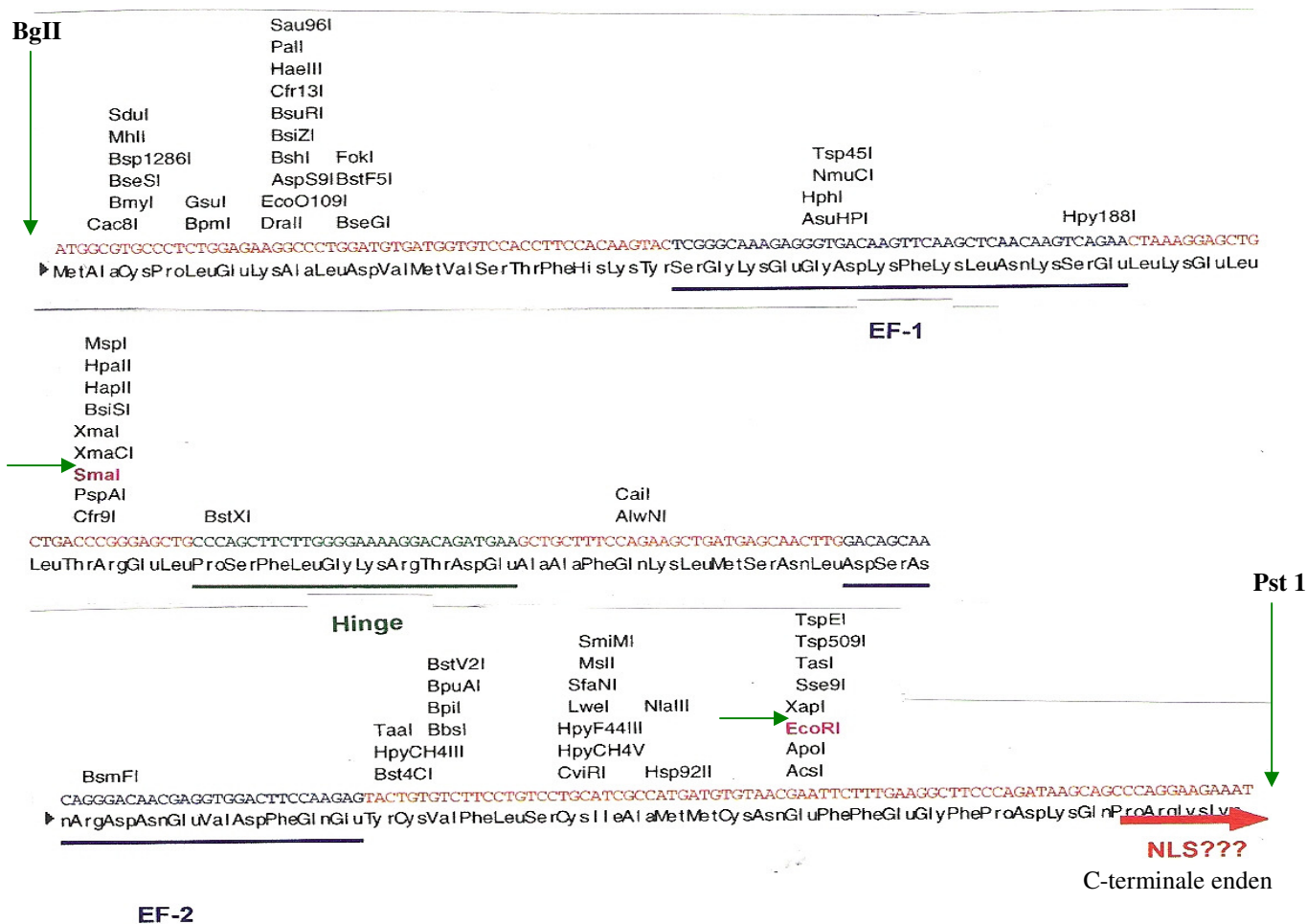


Fig. 2b) S100A4 fullengde med single kutteteser

### 3.2.2 Delesjonskonstrukter

For å lage delesjonskonstrukter av S100A4 proteinet kuttet vi CDS i to, på to ulike steder i sekvensen, og klonet disse bitene inn igjen i vektoren. Først ble pEGFP-C1 (tom vektor) linearisert. For dette formål brukte vi følgende restriksjonsenzymmer i kombinasjon;

- a) *Bg*III + *Eco*R1, og
- b) *Eco*R1 + *Pst*I

Under lineariseringsprosessen ble vektoren delt i to sekvenser. Disse lineariserte vektorbitene renses vi på agarose gel. Gel elektroforese separerer DNA på grunnlag av størrelse. Det minste båndet som består av deler av MCS ble senere erstattet med S100A4 konstruktet. Den andre delen som består av den lineariserte vektoren ble kontrollert og renses ved gel elektroforese. Denne ble brukt i den videre ligeringen.

Deretter ble følgende insert fra pEGFP-C1/S100A4 renses og isolert;

- a) insert på 250 bp, enzymene *Bg*III og *Eco*R1 ble benyttet i kombinasjon
- b) insert på 50 bp, enzymene *Eco*R1 og *Pst*I ble benyttet i kombinasjon

De samme enzymene ble brukt både for å isolere insert og for å linearisere den tomme vektoren. Dette var viktig for at S100A4 biten senere ville passe inn i vektoren, og kunne liggeres inn der, orientert riktig vei.

Tilslutt kan bitene som passer sammen kobles ved hjelp av DNA ligaser, a + a og b + b. Dermed er to delesjonskonstrukter blitt laget, som betegnes S100A4-250 bp og S100A4-50 bp. Delesjonskonstruktet på 50 bp ble ikke brukt i denne delen av prosjektet.

Den samme fremgangsmåten ble brukt for å lage de resterende konstruktene. For å isolere et insert på 215 bp, fordøyde vi pEGFP-C1/S100A4 med enzymet *Sma*I som kutter på to forskjellige steder i pEGFP-C1/S100A4 vektoren. *Sma*I ble også brukt for å linearisere pEGFP-C1 vektoren.

Når 215 bp kuttet bort fra proteinet, slik det ble gjort ovenfor, gjenstår 117 bp av S100A4. Denne biten kan på samme måte som tidligere beskrevet liggeres inn i vektoren, slik at produktet blir S100A4-117 bp ekspresjonskonstrukt.

### 3.3 Oppformering av plasmid

Transformasjonen av pEGFP/S100A4 plasmidet inn i bakterieceller er nødvendig for oppformering av plasmidet. Dette ble gjort ved varmesjokk. Energien som frigjøres ved sjokket gjør cellemembranen skjør nok til at cellen kan oppta plasmidet. Bakterieceller benyttes for dette formål blant annet fordi de har stor delingshastighet. De deler seg hvert 20 minutt. I denne prosessen blir samtidig også plasmidet replikert og fordoblet.

Etter transformasjonen ble bakteriecellene i løsning spredd ut på agarplater tilsatt Kanamycin, og inkubert over natt ved 37°C. Dagen etter fant vi vekst av bakterier på agarplatene, som hadde blitt tilsatt vekstmedium. Seleksjonsagens (antibiotika) og 5 ml LB-medium fordeles i



rør. En og en koloni plukkes fra platen og løses opp i hvert sitt rør. Rørene inkuberes på 37°C over natt i en risteinkubator. Inkuberingen førte til oppformering av bakteriene. Plasmidet renses fra bakteriecellene ved hjelp av et ferdig kit, maxi-/midi- eller miniprepp, Qiagen (Hilden, Tyskland).

### 3.4 Verifisering av delesjonskonstrukter

Etter isoleringen bekreftet vi at riktig plasmid var blitt oppformert ved å fordøye det med bestemte restriksjonsenzymer som kjenner igjen og spalter DNA i en bestemt nukleotidsekvens. Hvilket enzym man benytter avhenger av hvilket delesjonskonstrukt man har av S100A4 proteinet.

Deretter separerte vi kutteproduktene ved hjelp av agarosegel elektroforese. Gelen med prøvene ble plassert i et elektrisk felt, og på grunn av ladningen på overflaten til DNA vandrer det i dette feltet, fra den negative til den positive polen. Hvor raskt DNA bitene vandrer avhenger av deres lengde. DNA biter i en slik gel visualiseres ved at det farges med EtBr som interkalierer i DNA og som avgir lys når gelen legges på en UV-plate.

Standarder er DNA med bestemt lengde som fungerer som størrelsesmarkører. Ved hjelp av dem beregnet vi størrelsen på plasmidet, etter at gelen var ferdig kjørt og gelbildet var blitt fremkalt. På denne måten får man avgjort om man har oppformert det ønskede plasmidet med riktig DNA størrelse. Både fordøyd- og ufordøyd plasmid loades på gelen. Det ufordøyde plasmidet fungerer som en kontroll. I tilfelle plasmidet ikke ble skikkelig kuttet under inkuberingen, så vet man hvor båndet ville ha havnet. Dette sparer en for den usikkerheten som oppstår når man ser et ukjent bånd.

### 3.5 Transiente transfeksjoner

Det riktige plasmidet transfekterte vi inn i cancer cellelinjer ved hjelp av elektroporering. Transfeksjonene ble utført med en ECM 399 electroporator (BTX Products, Holliston, MA, US), hvor cellene ble blandet med ønsket mengde plasmid og så plassert i et elektrisk felt (240V). Elektrosjokket gjør cellemembranen ustabil slik at DNAet tas inn i cellene.

Deretter sådde vi ut cellene i 6-brønnsplater. Disse platene ble i første omgang inkubert i 24 timer. Denne tiden er nødvendig for at S100A4 sekvensen skal bli transkribert og translatert inne i cellene.

Senere i prosjektet ville vi finne ut av om lengden på inkuberingstiden hadde noen betydning for uttrykket av S100A4 proteinet. Derfor ble cellene også inkubert i hhv 48 og 72 timer. Tanken var at flere celler ville lyse hvis inkuberingstiden f. eks. ble økt fra 24t til 48t, fordi proteinsyntese er en tidkrevende prosess.

I starten tilsatte vi 6 µg plasmid til  $1,5 \times 10^6$  cancer celler. Senere ble det også foretatt transfeksjon med redusert mengde konsentrasjon av plasmid tilsatt hver kyvette, nemlig 1 µg og 3 µg per  $1,5 \times 10^6$  celler.

### 3.6 Western immunblotting

Western er en biokjemisk metode som innebærer at en løsning med proteiner, f. eks. cellelysat blir separert ved polyakrylamidgel elektroforese. Deretter blir alle proteinene blottet over på en nylonmembran og proteinet av interesse kan detekteres ved hjelp av et antistoff. Western kjøring vil i denne sammenhengen være en kontroll på at S100A4 faktisk er tilstede i vektoren, og ikke bare EGFP. I mikroskopet er det EGFP som lyser og som vi ser. S100A4 kommer ikke direkte til syne, det er derfor nødvendig med en kontroll på at proteinet faktisk blir produsert.

Etter blottingen blokkerte vi filteret med tørrmelk før immunfarging med antistoffer. Tørrmelk inneholder mange proteiner som binder seg til proteiner på filteret, og dermed hindrer uspesifikk binding av antistoffet spesielt det sekundære. Vi inkuberte deretter filteret med et primært antistoff, som produseres i kaniner immunisert med S100A4. Dette er et polyklonalt antistoff med ulike epitoper, som har en felles tung kjede nederst, og en lett kjede som er variabel avhengig av type antistoff. Det er i stand til å binde seg til S100A4 på filteret. Så inkuberte vi filteret med et sekundært antistoff som oppdyrkes i geit, og detekterer den tunge kjeden på kanin antistoffet. Altså blir det dannet et kompleks av S100A4, det primære og det sekundære antistoffet. Til slutt inkuberer man filteret med en ECL-løsning, som virker som et substrat for peroksidasen som er konjugert til det sekundære antistoffet. Når peroksidase-reaksjonen fant sted, lyste komplekset opp, og S100A4 ble synliggjort i form av svarte punkter på en røntgenfilm.

### 3.7 Mikroskopering

#### 3.7.1 Fluorescens

I første omgang ble fluorescensmikroskopet benyttet, der man bl.a. kan se på levende celler (Zeiss, Axiovert 200M, Tyskland). Fordelen med å bruke dette mikroskopet er at man slipper å fikse cellene, og dermed unngår risikoen for at det dannes artefakter. Man ser på resultatet av hele preparattykkelsen og bildene blir fremstilt todimensjonalt, der man ser på cellene nedenfra. Mikroskopet var utstyrt med tørrobjektiver og derfor skulle det ikke brukes olje på det. Adobe Photoshop bildeprogram (Mountain View, CA, US) ble brukt for å lage overlay bilder, som er resultatet man får etter å ha lagt fluorescens bilder av celler over vanlige sort-hvitt bilder av de samme cellene. Man kan dermed både se konturene av cellene og hvor i cellen fluorescensen er lokalisert.

#### 3.7.2 Konfokal

I et konfokalmikroskop (Leica, Wetzlar, Tyskland) kan man bl.a. se på fikserte celler. Den store fordelen med dette mikroskopet er muligheten til optisk snitting. Man samler informasjon fra bare et tynt plan som kan være tynnere enn preparatet, i motsetning til vanlig mikroskopi hvor man ser på resultatet av hele preparattykkelsen. Sammenlignet med et fluorescensmikroskop er det dermed i stand til å konstruere flere optiske snitt av preparatet tredimensjonalt. Dessuten blir bildene fremstilt med høy kontrast og høy resolusjon. Mange flere detaljer kommer frem, og man unngår å trekke uriktige konklusjoner når det gjelder nøyaktig hvor i cellen et bestemt produkt befinner seg, som f. eks. S100A4 proteinet.

### **3.7.2.1 Fiksering av preparater**

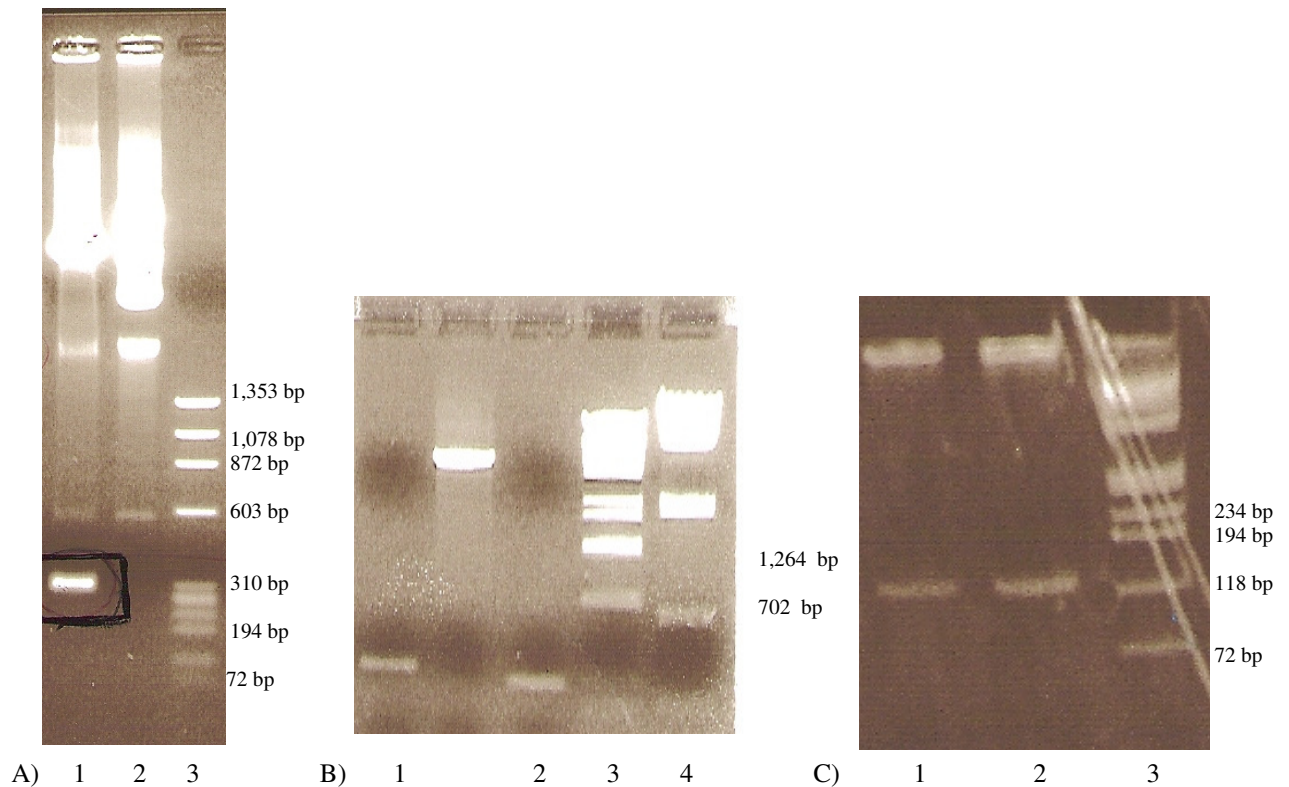
For å kunne se cellene i konfokalmikroskopet må de først fikseres. Det ble gjort med å dyrke cellene på 18 x 18 mm dekkglass, som ble sterilisert i 96 % etanol (EtOH). Selve fikseringen foregikk i brønnen, der vi begynte med å sugde av mediet forsiktig. Så satte vi platen på is, og tilsatte 1 ml iskald metanol (MeOH). Brønnen med cellene lot vi stå på is i 6 min. Deretter sugde vi av metanolen, og postfixerte i 1 % paraformaldehyd i fosfatbufret saltvann (PBS) i romtemperatur. Etter en halv time sugde vi av paraformaldehyd, og quenched cellene i 25 mM ammoniumklorid i PBS i romtemperatur i 5 min. Til slutt vasket vi en gang med PBS.

Dekkglasset ble montert før bruk med Vectashield, en løsning som bevarer fluorescens og holder begge glassene sammen. Hvis man ikke skal lage preparater med det samme kan man tilsette 2 ml PBS til hver brønn, og oppbevare cellene for senere bruk.

## **4. RESULTATER OG DISKUSJON**

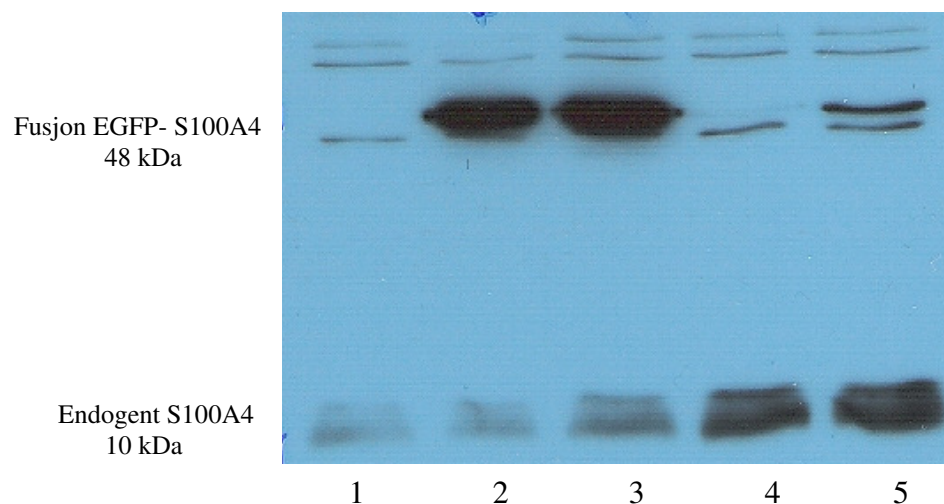
### **4.1 Verifisering av delesjonskonstrukter**

For å verifisere delesjonskonstruktene ble det tatt bilder av agarosegelkjøringer (fig.3), som viste oss bånd på forskjellige størrelser. F. eks. når vi så bånd på 250 bp og 215 bp, antok vi at de var hhv. 250- og 215 delesjonskonstrukter av S100A4. Teoretisk kunne det tenkes at disse båndene ikke var S100A4 sekvenser men andre produkter av samme størrelser. Siden bildene fra gelkjøringen ikke sikkert kunne fortelle oss at det var S100A4 delesjonskonstrukter som vi hadde konstruert, ble det derfor også utført Western immunblotting (fig.4). Spesifikke antistoffer ble benyttet for å synliggjøre delesjonskonstruktene. Western immunblot (s.11) verifiserer fullengde-, 250- og 117 konstruktene. Vi legger merke til at 215 konstruktet ikke finnes i OHS cellen. Hvorfor dette ble tilfellet er diskutert senere i oppgaven (s.14).



**Fig. 3 Agarosegel.** Bilder som verifiserer delesjonskonstruktene.

- A) 1. Viser insert på 300 bp, fullengde konstruktet. 2. Samme konstrukt, ukuttet.  
3. Standard, øX174 kuttet med HaeIII.
- B) 1. Viser insert på 250 bp. 2. Viser insert på 215 bp. 3. Standard, lambda kuttet med BstEII.  
4. Standard, lambda kuttet med HindIII
- C) 1 og 2. Viser insert på 117 bp. 3. Standard, øX174 kuttet med HaeIII



**Fig. 4 Western immunoblot**

Totalt proteinlysate fra transfekterte OHS celler farget med S100A4 antistoff, DAKO. Endogent S100A4 produseres av OHS celler, mens den rekken på bildet som er merket med 'fusjon EGFP-S100A4' viser mengden av de ulike konstruktene vi transfekterte inn i cellene.

- |                    |                                  |                    |
|--------------------|----------------------------------|--------------------|
| 1. pEGFP, vektor   | 2. S100A4, fullengde konstruktet | 3. 117 konstruktet |
| 4. 215 konstruktet | 5. 250 konstruktet               |                    |

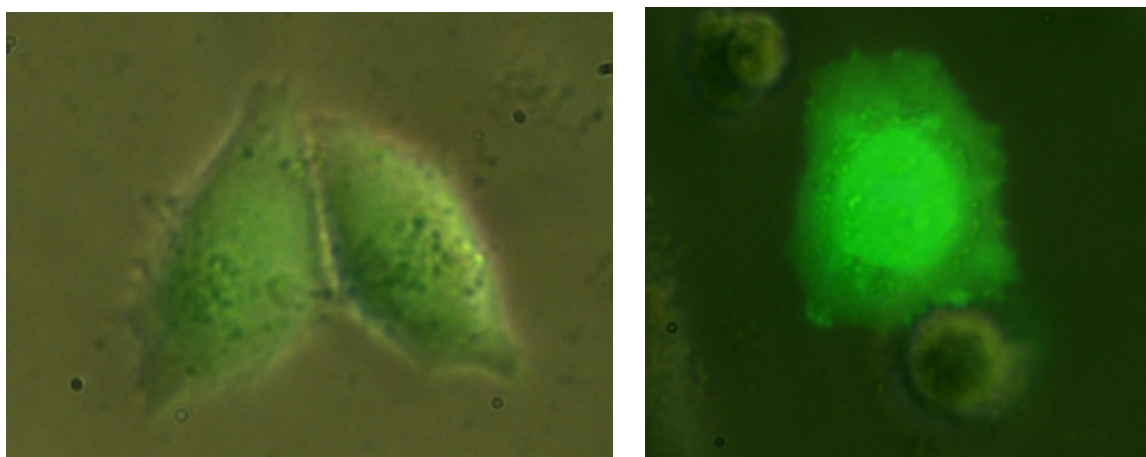
## 4.2 Fluorescensmikroskopering

De første transiente transfeksjoner ble foretatt med S100A4 fullengde konstruktet. Vi kunne se at fusjonsproteinet ble translokert til cellekjernen. Dette var grunnlaget for å lage tilsvarende delproteiner, til sammen tre stykker, for blant annet å teste hypotesen om hvilken del av proteinet som koder for et potensielt kjernelokaliseringssignal.

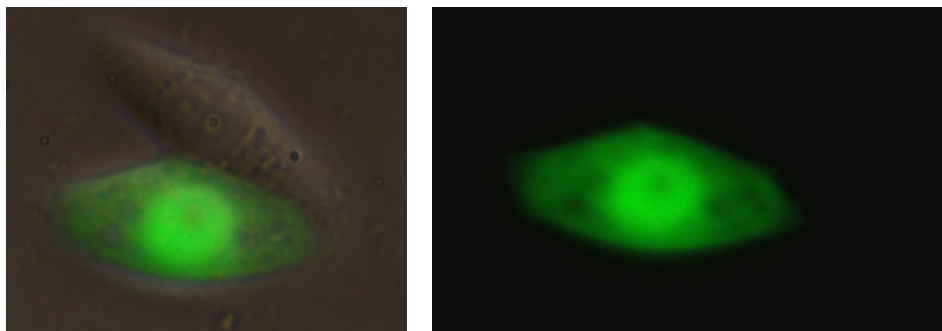
I første omgang tok vi bilder av cellene etter 24 timers inkubering. Det ble tatt bilder med alle fire konstrukter i tillegg til vektor alene. Alle cellene lyste grønt i mikroskopet. Det var et tegn på at de hadde klart å oppta de ulike plasmidene, og at sannsynligvis både EGFP og S100A4 hadde blitt uttrykt.

Hovedspørsmålene som skulle besvares var om de fire konstruktene fordeler seg ulikt mellom kjerne og cytoplasma i cancer celler, og om det er noen forskjeller i fordelingen av konstruktene avhengig av celletype. Vi forventet å få ulik fordeling av grønnfarge i cellene avhengig av hvilket delesjonskonstrukt som ble brukt, men ved hjelp av fluorescensmikroskopet var det ikke mulig å detektere noen forskjell i den intracellulære lokalisasjonen av konstruktene. Vi kunne heller ikke se noen forskjell i fordelingen av proteinet avhengig av hvilken cellelinje som ble brukt (fig.5). Det inntrykket man satt igjen med etter billedtakingene var at fargen oftest var jevnt fordelt utover cytoplasmaet, men med sterkere farge i cellekjernen. Dette kunne verifiseres med å forstørre cellene, slik at det kom tydeligere frem at fargen var mer konsentrert i kjernen. Det samme resultatet kan vises ved å redusere lyset i bildene. Da blir cytoplasmaet mindre synlig, samtidig som vi ser at kjernen lyser sterkest.

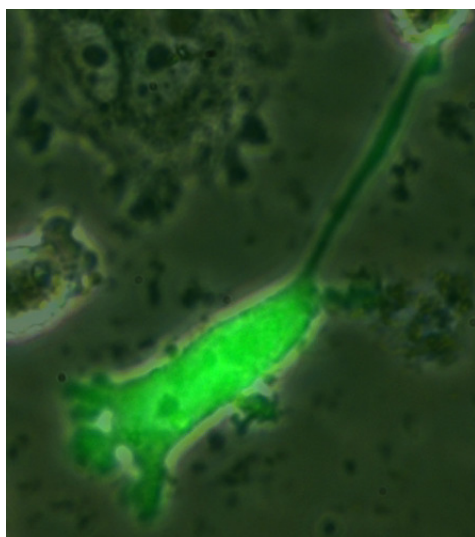
**Fig.5** Det er ingen forskjell i fordelingen av de ulike konstruktene i de fem cellelinjene som ble brukt. Som et eksempel vises celler transfektert med 250 konstruktet.



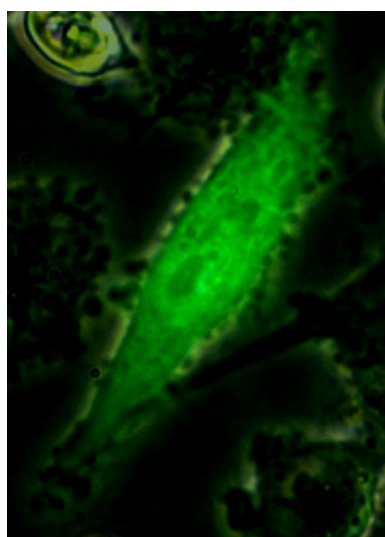
A) Hela celler med 250 konstruktet



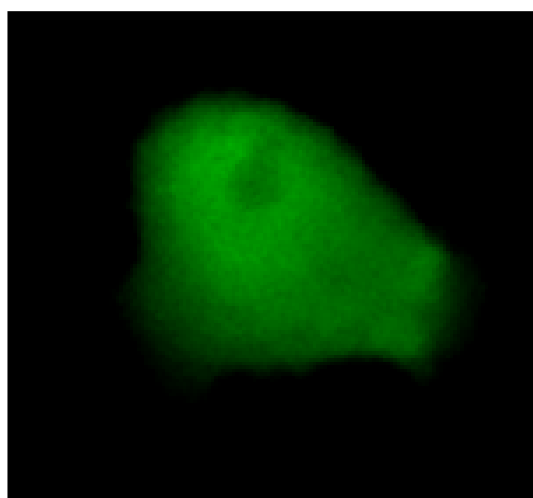
**B)** PM1 celler med 250 konstruktet



**C)** II-11b celle med 250 konstruktet



**D)** OHS celle med 250 konstruktet



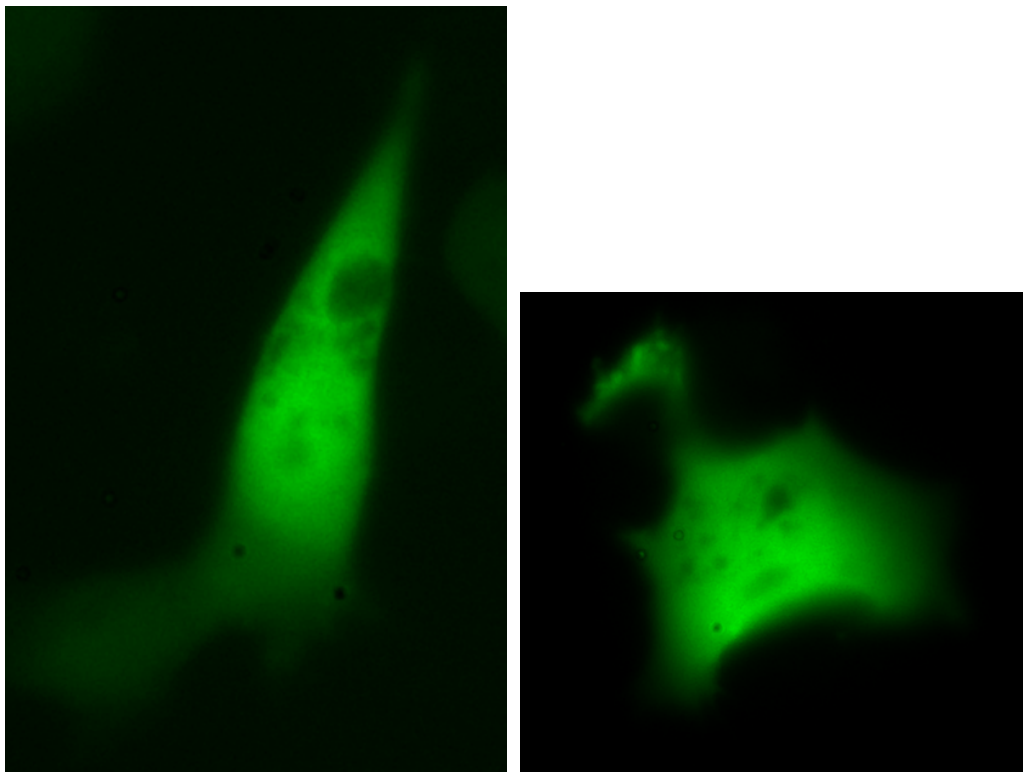
**E)** SW620 celle med 250 konstruktet

## 250 konstruktet

I fig. 6 er det vist et eksempel fra OHS celler som viser at 250 konstruktet ikke ga noe annerledes fordeling av grønnfarge i cellene sammenlignet med fullengde konstruktet. Det samme fant vi også i de andre cellelinjene. Hypotesen var at de 50 bp som ble kuttet fra proteinet ved tillaging av dette konstruktet, koder for et potensielt kjernelokaliseringssignal. Derfor burde det lyse sterkest i cytoplasmaet, ettersom signalet som skulle lede proteinet til cellekjernen da var borte.

En mulig forklaring kan være at S100A4 passivt og raskt diffunderer inn i kjernen fra cytoplasmaet. Dette fordi det er et forholdsvis lite protein. Dessuten kan det tenkes at vi fikk et feil inntrykk av proteinets lokalisasjon. Dette kan skyldes fluorescensmikroskopets begrensninger, der man ser på cellene nedenfra og kun et todimensjonalt bilde av cellene blir fremstilt. Det var derfor vanskelig å fastslå om fusjonsproteinene ble translokert inn i kjernen eller om de var bundet på utsiden av kjernemembranen.

Etter bruk av dette mikroskopet var det altså ikke mulig å si noe mer konkret om fordelingen av S100A4 proteinet bortsett fra at det ikke distribueres jevnt i cellen. For å komme nærmere svaret ble det derfor senere brukt et konfokalmikroskop.



**Fig. 6.** A) OHS celle transfektert med S100A4 fullengde konstruktet  
B) OHS celle transfektert med 250 konstruktet



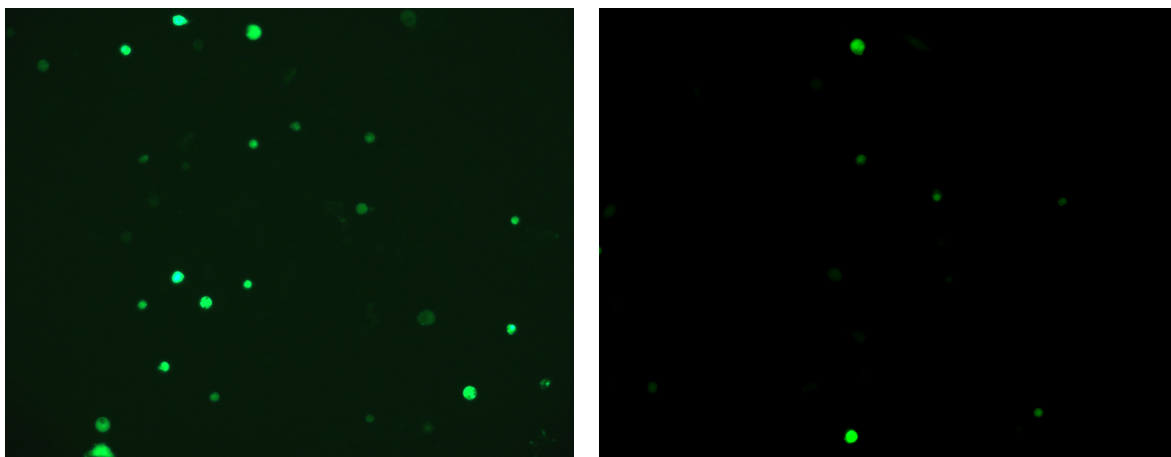
## 215- og 117 konstruktet

Et av delesjonskonstruktene som skilte seg klart ut fra de resterende var 215 konstruktet. Det lyste dårlig uavhengig av hvilken cellelinje det ble transfektert i. Den eneste fornuftige forklaringen vi kunne tenke oss på det tidspunkt var at proteinsyntese- eller foldingsteorien (hhv. s.16 og s.20) gjorde seg gjeldende i denne sammenhengen. Men noen måneder etter at dette prosjektet var avsluttet, ble alle konstruktene sekvensert. Det ble da oppdaget at 215 konstruktet hadde feil sekvens, det vil si at det produktet på 215 bp som vi så på agarosegel bildet (fig.3) ikke var et delesjonskonstrukt av S100A4 proteinet. Det var et annet ukjent produkt på nøyaktig samme størrelse. Dette kan forklare hvorfor det lyste så dårlig ved transfeksjon i cellene. Dette forklarer også hvorfor vi med Western immunblotting ikke klarte å detektere 215 konstruktet i OHS cellene. For å trekke noen konklusjon om dette konstruktet og om EF-hånd 2 bør vi produsere det på nytt med riktig sekvens og gjenta alle transfeksjonsforsøkene.

117 konstruktet fordelte seg heller ikke noe annerledes enn de andre konstruktene i cellene, og hypotesen om EF-hånd 1 ble ikke bekreftet etter bruk av fluorescensmikroskopet. Vi måtte derfor ta i bruk konfokalmikroskopet senere i prosjektet (s.17).

## EGFP vektor alene vs. S100A4 fullengde konstruktet

Det viste seg at prosentandelen av celler som lyste med EGFP vektor alene var større enn celler transfektert med de andre konstruktene, f. eks. S100A4 fullengde konstruktet (fig.7). Dette var en tendens uavhengig av cellelinje. F. eks. ved bruk av vektor alene lyste ca. 90 % av OHS cellene, mens ved bruk av de andre konstruktene var prosentandelen lysende celler kun 30-40 %. En mulig forklaring kan være at S100A4 påvirker fluorescens-egenskapen til EGFP eller uttrykket av EGFP- sekvensen i fusjonsproteinet. En annen forklaring er at fusjonsplasmidene transfekteres og/eller transkriberes i mindre grad enn tom vektor.



**Fig. 7.** A) OHS celler transfektert med EGFP vektor alene  
B) OHS celler transfektert med S100A4 fullengde konstruktet



## SW620 celler

SW620 celler lyste nærmest ikke i det hele tatt uansett lengden på inkuberingstiden. Ofte ble det ikke funnet flere enn kun én lysende celle i hele tre inkuberte brønner. Prosentandelen celler som lyste ved transfeksjon av vektor alene var ca. 5 %. Antall lysende celler transfektert med de ulike fusjonsproteinene kunne anslås til litt i underkant av 1 %. Når man sammenligner disse tallene med OHS celler er det oppsiktsvekkende stort avvik, ettersom henholdsvis 90 % og 30-40 % av de transfekterte OHS cellene lyste. En mulig hypotese for hvorfor det var så få SW620 celler som lyste er at transfeksjonseffektiviteten i disse cellene er lavere sammenlignet med de andre celletypene. Denne hypotesen er begrunnet med at transfeksjonsbetingelser ofte må optimaliseres for den enkelte cellelinje. Dette gjelder faktorer som plasmid og cellemengde samt effekt og lengde av elektroforeringen.

Hypotesen kan testes ved å så ut SW620 og de andre celletypene med alle fire konstrukter. Deretter isoleres både genomisk- og plasmid DNA fra konstruktene. DNAet blir videre spaltet ved hjelp av restriksjonsenzymmer og DNA fragmentene separeres på basis av størrelse ved å kjøre en Southern gel. Formålet er å kunne visualisere DNA av interesse på gelen. For å hindre at alle DNA segmentene kommer til syne som overlappende bånd kan prober brukes. En probe er en sekvens som er komplementær til det DNA som skal detekteres, og hybridiserer kun med det. I dette tilfellet skal EGFP og S100A4 detekteres, og EGFP-CTP\* blir benyttet. Proben vil enten være merket med radioaktive isotoper eller være farget med fluorescens. De mørke båndene som dukker opp når røntgen bildet blir fremkalt symboliserer proben som har hybridisert til restriksjonsfragmentet. Dermed synliggjøres mengden plasmid i cellene. For å verifisere hypotesen om at transfeksjonseffektiviteten i SW620 cellene er lavere enn i de andre cellelinjene bør det være et mindre intenst bånd i SW620 enn i OHS, PM1, Hela og II-11b.

En annen mulig forklaring på denne problemstillingen kan være at proteinsyntesen av EGFP-delen av plasmidet er lavt i denne cellelinjen, og blir inhibert i enda større grad ved tilstedeværelse av S100A4. Denne påstanden kan begrunnes med at vektor alene heller ikke ble uttrykt i like høy grad som i de andre cellelinjene. En mulig metode for å teste denne hypotesen er å kjøre en Western. Antistoffet blir rettet mot EGFP som isoleres fra SW620 cellene. På denne måten finner man ut hvor mye EGFP som finnes i disse cellene. Hvis mengden EGFP er mindre sammenlignet med de andre celletypene verifiseres hypotesen om at proteinsyntesen er lav i SW620 cellene. Men hvis S100A4 alene er årsaken til inhibert proteinsyntese i denne cellelinjen, er det vanskelig å forklare hvorfor resultatet ikke påvirkes i like høy grad i de andre cellelinjene, med samme prosentvise antall færre lysende celler.

## Inkuberingstid

OHS- og SW620 celler ble benyttet for å teste om lengden på inkuberingstiden hadde noen betydning for uttrykket av S100A4 proteinet. Det var spesielt interessant å kjøre et slikt forsøk med SW620, siden disse cellene lyste betydelig svakere etter 24t enn de andre cellelinjene. Et bedre resultat etter lengre tids inkubering ville da være iøyenfallende.

Resultatet etter gjentatte forsøk med begge cellelinjer var at antall lysende celler var omtrent det samme etter 24 og 48 timers inkubering. Derimot ble det oppdaget at betydelig færre celler lyste etter 72t sammenlignet med antall celler som lyste etter 24t. Dessuten lyste også cellene med lavere intensitet. Forklaringen kan være at flere og flere celler dør etter hvert som

de blir liggende i brønnen, blant annet fordi vekstmediet blir brukt opp. Dessuten lekker det ut toksiske stoffer fra de døde cellene som også påvirker omkringliggende celler og forgifter miljøet. EGFP i seg selv er også toksisk. Disse faktorene samlet fører til at cellene uttrykker proteinet mindre over tid.

Resultatet kan også begrunnes med at cellekulturen er veldig tett etter 72 timers inkubering. Cellene har da delt seg gjentatte ganger, og de opprinnelige cellene som tok opp plasmidet ved transfeksjonen har gått til grunne. Det var de som ville ha uttrykt proteinet best. Dessuten må det også tas i betraktning at ved celledeling vil ikke nødvendigvis plasmidet som ble inkorporert i dem fordoble seg. Det kan derfor egentlig ikke forventes at flere celler i brønnen skal lyse.

Konklusjonen er at de beste bilder av celler som uttrykte proteinet fikk vi etter 24 timers inkubering.

### **Plasmidkonsentrasjon**

Redusert mengde plasmid hadde ingen betydning for hvordan cellene så ut i mikroskopet, og for antall lysende celler. Vi fant dermed ut at plasmidmengden ikke er den begrensende faktor for effektiviteten av transfeksjonene i våre forsøk, og har ingen betydning for de resultater som var av interesse.

### **4.3 Konfokalmikroskopering**

Konfokalmikroskopet ble benyttet senere i prosjektet siden man ikke kunne oppdage noen forskjell i fordelingen av konstruktene, og den eksakte lokalisasjonen av S100A4 proteinet i cellene etter bruk av fluorescensmikroskop.

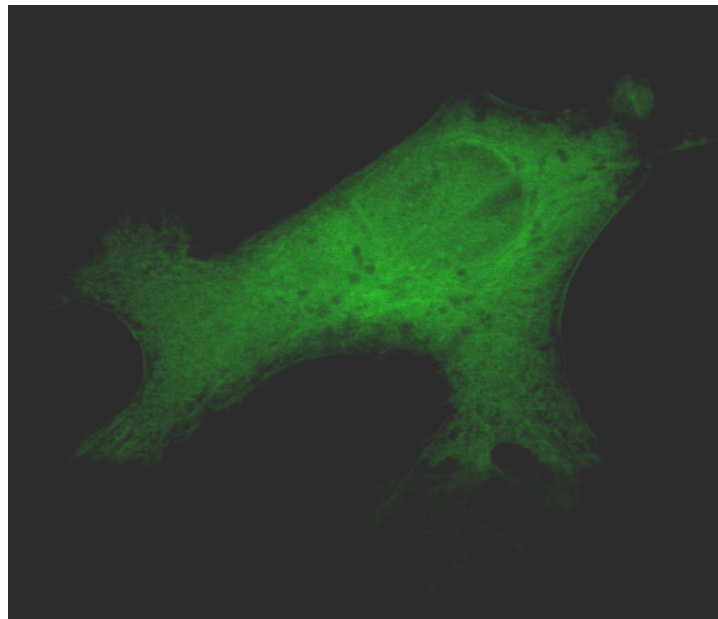
Resultatet fra fluorescensmikroskopet var at S100A4 ikke fordelte seg noe nevneverdig annerledes i de forskjellige celletypene. Med dette som grunnlag ble det bestemt å bare fortsette med en cellelinje fremover når konfokalmikroskopet skulle benyttes, nemlig OHS celler. Disse cellene ga tilfredsstillende resultater både med tanke på dyrkning, vedlikehold og transfeksjonseffektivitet.

Det ble lagt merke til ved bruk av dette mikroskopet at ingen av konstruktene førte til at nuklei i cellene ble farget noe særlig, i motsetning til det som hadde blitt observert i fluorescensmikroskopet. Som tidligere beskrevet fremstilles et todimensjonalt bilde av cellene ved bruk av et fluorescensmikroskop, og når vi trodde at det var kjernen som lyste grønt, var det sannsynligvis cytoplasmaet som lå over kjernen, slik at det ga et misvisende inntrykk av at proteinet hadde blitt translokert dit. Dessuten ble det observert at celler som hadde utløpere hadde en sterk lysende grønnfarge i enden av disse utløperne. Dette så vi også i noen få celler i fluorescensmikroskopet, men resultatet var tydeligere i konfokalmikroskopet (fig.5C og fig.8B).

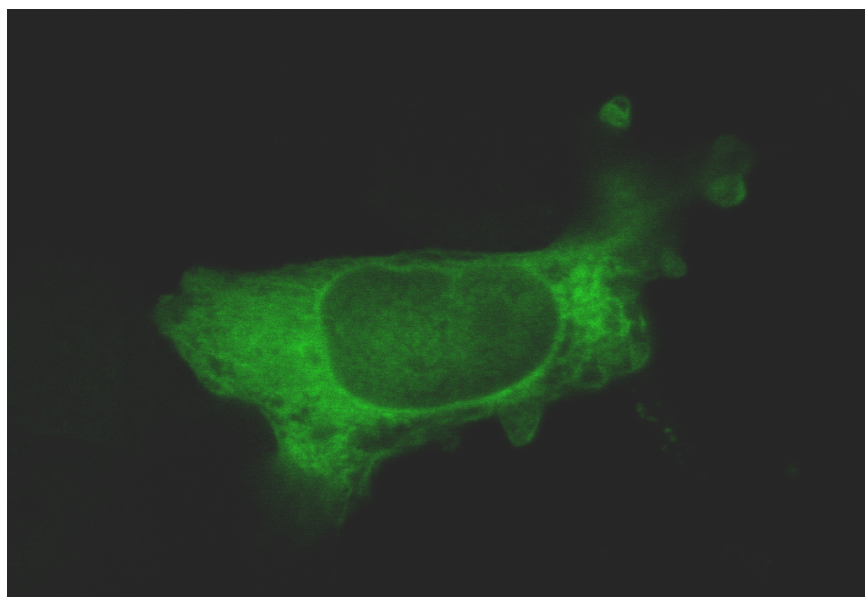
Konfokalmikroskopet ga oss det samme resultat som fluorescensmikroskopet, at alle delesjonskonstruktene fordelte seg likt i cellene. Men fordelingen av EGFP-S100A4 var

annerledes enn EGFP alene. Cellene som ble transfektert med kun EGFP lyste jevnt utover i hele cellen, med også farget cellekjerne (fig.8a). Det nye man kunne se var at cellene som ble transfektert med EGFP-S100A4 hadde en perinukleær sone som lyste forholdsvis sterkt (fig.8b).

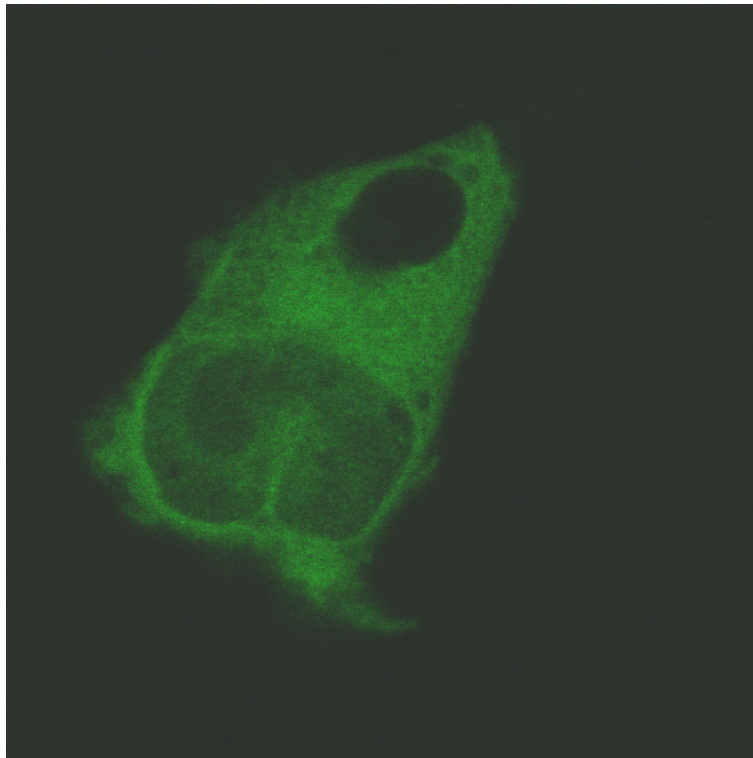
Som bildene i fig.8 og 9 viser, fordeler fullengde-, 250 og 117 konstruktene seg likt i OHS celler. På grunnlag av dette trekkes den samme konklusjonen som tidligere, at NLS i C-terminale enden av S100A4 ikke har noen betydning for kjernelokalisering. Forsøkene med 117 konstruktet viste at EF-hånd 1 heller ikke har betydning for subcellulær lokalisering (fig.9). 215 konstruktet som inneholder EF-hånd 2 hadde som tidligere beskrevet feil sekvens, så dette konstruktet kan vi ikke si noe sikkert om.



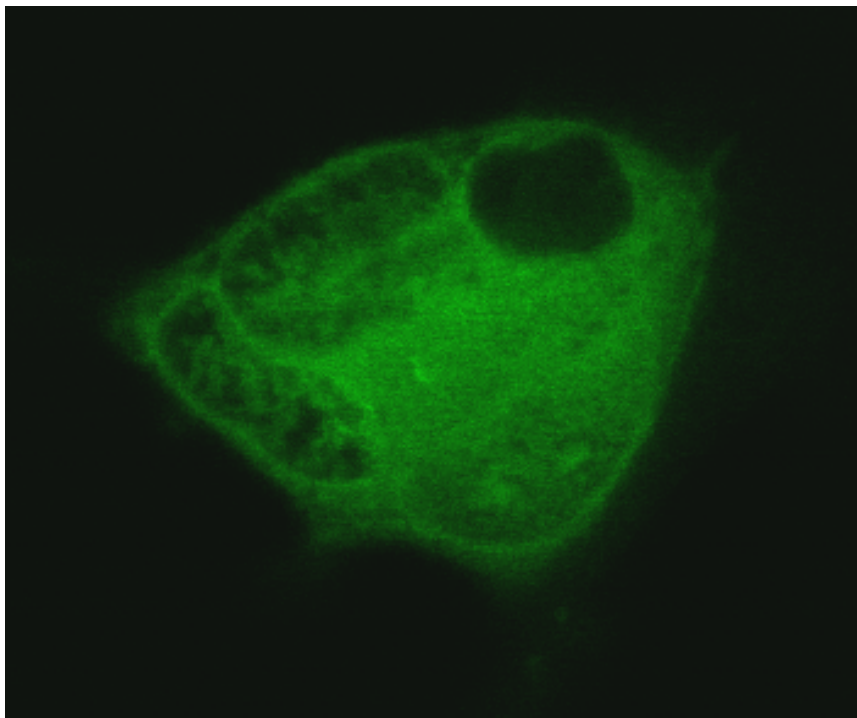
**Fig.8 A)** OHS celle transfektert med EGFP vektor alene



**B)** OHS celle transfektert med EGFP-S100A4, fullengde konstruktet



**Fig.9 A)** OHS celle tranfektet med 117 konstruktet



**B)** OHS celle transfektet med 250 konstruktet

En mulig forklaring på hvorfor våre hypoteser ble avkreftet kan være at S100A4 ikke klarer å oppføre seg på samme måten i fusjon med EGFP som det gjør som fritt protein. S100A4 er et lite protein som består av kun 101 aminosyrer (12 kDa), og dermed utgjør bare 1/3 av EGFP. Dermed kan det tenkes at EGFP er den bestemmende faktoren for hvor proteinet havner i cellen.

Det kan også være tilfellet at dette lille proteinet diffunderer passivt over kjernemembranen via kjerneporer, slik at vi får feil inntrykk av dets lokalisasjon.

Dessuten kan det tenkes at foldningsteorien gjør seg gjeldende her, det vil si at tilstedeværelse av S100A4 påvirker EGFP-delen av plasmidet slik at det blir undertrykt. F. eks. kan halen til S100A4 forandre foldingen til fusjonsproteinets når det blir inkorporert i plasmidet. Dermed endres proteinets tredimensjonale struktur, som er av avgjørende betydning for dets funksjon og egenskaper. Dette kan være en mulig forklaring på hvorfor vi ser forskjell på EGFP alene sammenliknet med EGFP-S100A4 fusjon.

## **OHS celler**

Konfokal mikroskopi avslørte også at innad i populasjonen av OHS celler som hadde blitt transfektert med det samme konstruktet var det noen celler som lyste sterkest kun perinukleært. Dette kunne man hyppigere se i celler som hadde to kjerner. Dette kan forklares med at celler befinner seg i forskjellige faser til ulike tider. Fargefordelingen er avhengig av hvor cellen er i cellesyklusen, om den er i M-, S- eller i G<sub>1</sub> fasen. Celler i ulike faser vil lede proteinet til forskjellige lokalisasjoner. Eventuelt kan det tenkes at når celler er i ferd med å dø, f. eks. undergå apoptose, vil fordelingen av proteinet forandre seg i cellen. Vi vet ikke sikkert om dette er grunnen til det som ble observert før det blir undersøkt nærmere. Det finnes apoptose-markører som kan benyttes for den typen studier.

## **5. KONKLUSJON**

Målsetningen til dette prosjektet var å studere hvilke deler av S100A4 proteinet som har betydning for subcellulær lokalisasjon. Hypotesen var at den C-terminale delen av proteinet koder for et kjernelokaliseringssignal. For å undersøke dette lagde vi delesjonskonstrukter av proteinet. Vi konstruerte også fusjonsproteiner av S100A4 som kun inneholdt den ene av de to kalsiumbindende EF-hendene som man antar binder seg til DNA. Hypotesen var at bare den ene hånden av proteinet muligens ikke ville være tilstrekkelig for binding til DNA, og delesjon av en EF-hånd ville resultere i at proteinet ikke lenger forble i cellekjernen.

Studier av celler i fluorescens- og konfokalmikroskop viste at NLS i C-terminale enden av S100A4 sannsynligvis ikke har noen betydning for kjernelokaliseringen. Forsøkene kunne heller ikke bekrefte at EF-hånd 1 har signifikant betydning for subcellulær lokalisering. Etter at dette prosjektet var avsluttet ble det oppdaget at 215 konstruktet som skulle inneholde EF-hånd 2 hadde feil sekvens. Så dette konstruktet kan vi ikke si noen sikkert om foreløpig. Dermed er begge våre hypoteser om NLS og EF-hånd 1 inntil videre forkastet.

Den konklusjonen vi kan trekke fra våre forsøk er at for å studere lokalisasjonen av S100A4 proteinet mer eksakt i cellene bør det benyttes en annen markør enn EGFP. Dette proteinet er tre ganger større enn S100A4, og derfor er EGFP høyst sannsynlig av avgjørende betydning for hvor S100A4 havner i cellene. Vi har dermed muligens ikke klart å få et godt nok inntrykk av hvordan delesjonskonstruktene egentlig oppfører seg. For å validere resultatene kunne man derfor supplere forsøkene ovenfor med andre metoder, f. eks. med bruk av S100A4 spesifikke antistoffer i immunfluorescensstudier.

## REFERANSER

1. Fidler IJ: **The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**(6):453-458.
2. Liotta LA: **Cancer cell invasion and metastasis.** *Sci Am* 1992, **266**(2):54-59, 62-53.
3. Bogenrieder T, Herlyn M: **Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis.** *Oncogene* 2003, **22**(42):6524-6536.
4. Maeldandsmo GM, Hovig E, Skrede M, Engebraaten O, Florenes VA, Myklebost O, Grigorian M, Lukanidin E, Scanlon KJ, Fodstad O: **Reversal of the in vivo metastatic phenotype of human tumor cells by an anti-CAPL (mts1) ribozyme.** *Cancer Res* 1996, **56**(23):5490-5498.
5. Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, Grigorian M: **The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis.** *Br J Cancer* 2005, **92**(11):1955-1958.
6. Gongoll S, Peters G, Mengel M, Piso P, Klempnauer J, Kreipe H, von Wasielewski R: **Prognostic significance of calcium-binding protein S100A4 in colorectal cancer.** *Gastroenterology* 2002, **123**(5):1478-1484.
7. Rudland PS, Platt-Higgins A, Renshaw C, West CR, Winstanley JH, Robertson L, Barraclough R: **Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer.** *Cancer Res* 2000, **60**(6):1595-1603.
8. Takenaga K, Nakamura Y, Endo H, Sakiyama S: **Involvement of S100-related calcium-binding protein pEL98 (or mts1) in cell motility and tumor cell invasion.** *Jpn J Cancer Res* 1994, **85**(8):831-839.
9. Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, Kriajevska M, Carlberg C, Kruse C, Cohn M, Ambartsumian N, Christensen A, Selivanova G *et al*: **Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis- associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction.** *J Biol Chem* 2001, **276**(25):22699-22708.
10. Flatmark K, Pedersen KB, Nesland JM, Rasmussen H, Aamodt G, Mikalsen SO, Bjornland K, Fodstad O, Maeldandsmo GM: **Nuclear localization of the metastasis-related protein S100A4 correlates with tumour stage in colorectal cancer.** *J Pathol* 2003, **200**(5):589-595.
11. Schmidt-Hansen B, Klingelhofer J, Grum-Schwensen B, Christensen A, Andresen S, Kruse C, Hansen T, Ambartsumian N, Lukanidin E, Grigorian M: **Functional significance of metastasis-inducing S100A4(Mts1) in tumor-stroma interplay.** *J Biol Chem* 2004, **279**(23):24498-24504.
12. Schmidt-Hansen B, Ornas D, Grigorian M, Klingelhofer J, Tulchinsky E, Lukanidin E, Ambartsumian N: **Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity.** *Oncogene* 2004, **23**(32):5487-5495.
13. Semov A, Moreno MJ, Onichtchenko A, Abulrob A, Ball M, Ekiel I, Pietrzynski G, Stanimirovic D, Alakhov V: **Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation.** *J Biol Chem* 2005, **280**(21):20833-20841.
14. Fodstad O, Brogger A, Bruland O, Solheim OP, Nesland JM, Pihl A: **Characteristics of a cell line established from a patient with multiple osteosarcoma, appearing 13 years after treatment for bilateral retinoblastoma.** *Int J Cancer* 1986, **38**(1):33-40.
15. Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, 3rd, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND: **Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines.** *Cancer Res* 1976, **36**(12):4562-4569.